



Title of the Prior Art

Japanese Published Patent Application No.3-75552

Date of Publication: March 29, 1991

Concise Statement of Relevancy

Translation of a paragraph in page 2, lower right column, lines 3-12

Next, a gold (Au) thin film 3 (thickness of $100\mu\text{m}$) is formed as a metal electrode by vacuum deposition, and a groove 4 is formed on this Au thin film 3 using a dicing saw or, more simply, a razor blade, thereby dividing the Au thin film into two electrodes 3a and 3b. The width of this groove 4 is about $100\mu\text{m}$, and there is no electrical continuity between the electrodes 3a and 3b. Lead wires 7,7 are connected to these electrodes 3a and 3b using silver pastes 6,6, respectively. Further, the metal constituting the electrodes 3a and 3b is not limited to gold, and a design change may be appropriately made.

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平3-75552

⑤ Int. Cl.³

G 01 N 27/12
27/327

識別記号

N

庁内整理番号

9014-2G

⑬ 公開 平成3年(1991)3月29日

7235-2G G 01 N 27/30 3 5 3 Z

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全5頁)

⑭ 発明の名称 酵素電極

⑮ 特 願 平1-211907

⑯ 出 願 平1(1989)8月17日

⑰ 発 明 者 谷 口 功 熊本県熊本市東町4番地18号 東町北住宅14-2111
⑱ 発 明 者 滝 澤 耕 一 京都府京都市下京区中堂寺南町17番地 サイエンスセンタ
ービル 株式会社立石ライフサイエンス研究所内
⑲ 出 願 人 オムロン株式会社 京都府京都市右京区花園土堂町10番地
⑳ 代 理 人 弁理士 中村 茂信

明 細 書

1. 発明の名称

酵素電極

2. 特許請求の範囲

(1) 少なくとも1対の電極と、これら電極間を橋絡する導電性有機高分子膜と、この導電性有機高分子膜上に形成され、検体中の生化学物質と反応する酵素を固定した固定化酵素膜とを備え、この固定化酵素膜内での酵素反応の生成物により前記導電性有機高分子膜が酸化又は還元されて、その導電率が変化する酵素電極。

3. 発明の詳細な説明

(イ) 産業上の利用分野

この発明は、検体中の生化学物質の濃度を酵素反応を利用して電気的に測定するための酵素電極に関する。

(ロ) 従来の技術

従来、検体中の生化学物質濃度を測定するのに、この生化学物質を基質とする酵素を利用して、生化学物質と酵素との反応生成物の濃度を電気的に

測定する、いわゆる酵素電極が用いられている。

この酵素電極は、アンペロメトリック型とポテンシオメトリック型の2種類に大別することができる。

アンペロメトリック型の酵素電極は、作用電極、対照電極を有し少なくとも作用電極感応部に固定化酵素膜を装着したものである。この酵素電極は、電極間に所定の電圧を印加した状態で検体中に浸漬し、酵素反応に伴う電流変化を検出して、測定対象の生化学物質の濃度を知るものである。

一方、ポテンシオメトリック型の酵素電極は、電極とイオン選択膜とを有し、イオン選択膜の検体側に固定化酵素膜を形成してなるものであり、酵素反応に伴うイオン濃度変化を電極間の電位差として検出し、検体中の生化学物質の濃度を知るものである。現在、イオン選択膜としてガラスを用いたものが市販されている。

(ハ) 発明が解決しようとする課題

上記アンペロメトリック型の酵素電極は、以下に列記する問題点を有している。

- ①作用電極感応部に対して対照電極感応部は一定面積以上なければ安定した電流変化が得られない。また、汚れによる感応部面積の減少に対処するためにも、ある程度以上の電極感応部面積が必要である。従って、酵素電極の小型化が困難である。
- ②固定化酵素膜あるいは電極など高インピーダンス部分を通して信号を取り出しているため、その信号が小さく、外来ノイズや高入力抵抗による障害を受けやすい。このため、測定回路にこれら障害を除去する手段が要求され、また酵素電極に定電圧を印加する機能も必要であるので、測定回路が複雑化する。
- ③検体中の干渉物質を排除する選択性透過膜が必要であり、作用電極の構造が複雑化し、その製作も困難となる。
- ④生化学物質濃度の測定可能な範囲が狭い。
- ⑤測定回路に電源を投入してから、酵素電極の出力（バックグラウンド）が安定するのに要する時間（エージング）が長い。

一方、従来のポテンシオメトリック型酵素電極

できる。

この発明の酵素電極では、電極出力は電極間隔（ギャップ）によって決まり、電極面積に依存しないので、電極の小型化を図ることが可能となる。

また、この酵素電極は、電流計測でも電位差計測でもなく、導電率を検出するものであり、アンペロメトリック型、ポテンシオメトリック型の測定性能上の問題点を解消することができる。

さらに、イオン選択性膜、選択性透過膜が不要であり、電極の構成が簡単となり製造が容易であると共に、耐久性も向上する。

(ホ) 実施例

この発明の一実施例を図面に基づいて説明する。

この実施例は、この発明をグルコース測定に適用したものであり、第1図は実施例酵素電極1を示す図、第2図は、同酵素電極1の製作中の一過程を示す図である。以下、製作工程を追いながら、実施例酵素電極1を説明する。

まず、絶縁性の基板2を用意する（第2図参照）。この実施例では、大きさ20mm×10mmのガラス

は、以下に列挙する問題点を有している。

- ①イオン選択膜が必要で、その検体側にさらに固定化酵素膜を設けているから、やはり構造が複雑で、製作が困難である。
- ②応答が遅く、電極出力にドリフトが生じる。
- ③使用耐久性が低く、実用性に欠ける。
- ④生化学物質濃度の測定可能範囲が狭い。

この発明は上記に鑑みなされたものであり、小型化、高性能化、製作容易化等を図った酵素電極の提供を目的としている。

(ニ) 課題を解決するための手段及び作用

上記課題を解決するため、この発明の酵素電極は、少なくとも1対の電極と、これら電極間を橋結する導電性有機高分子膜と、この導電性有機高分子膜上に形成され、検体中の生化学物質と反応する酵素を固定化した固定化酵素膜とを備え、この固定化酵素膜内での酵素反応の生成物により、前記導電性高分子膜が酸化又は還元されて、その導電率が変化するものであり、この導電率の変化をとらえて検体中の生化学物質濃度を知ることが

板を用いているが、基板の大きさ、材料はこれに限定されるものではない。

次に電極金属として金（Au）薄膜3を真空蒸着により形成し（厚さ100μm）、この金薄膜3をダイシングソウあるいはより簡便にはカミソリ刃を用いて溝4を形成し、2つの電極3a、3bに分離する。この溝4の幅は約100μmであり、電極3a、3b間の電気的導通は皆無である。これら電極3a、3bには、それぞれ銀ペースト6、6を用いてリード線7、7が接続される。なお、電極3a、3bを構成する金属は、金に限定されるのではなく、適宜設計変更可能である。

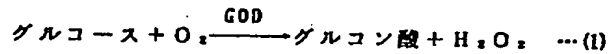
さらに、電極（露出）面3cを定め、他を絶縁性膜5で被覆する。この絶縁性膜5を形成するには、基板2上に感光性樹脂（例えば感光性ポリイミド）を塗布し、これをホトムスク（図示せず）を使用して露光して現像し、電極面3c上の感光性樹脂を除去する方法、あるいは電極面3c上の部分を除いてエポキシ樹脂で被覆する方法がある。この実施例では、後者の方法によっており、電極

面3cの大きさは3mm×6mmとしている。なお、電極面3cの面積はそれほど厳密に定める必要はない。

次に、電極面3c上にポリアニリン膜(導電性有機高分子膜)8を電解重合により形成する。使用する電解液は、0.1モル硫酸1ℓあたり0.1モルのアニリンを含むもので、この電解液中に对照電極(図示せず)と共に第2図の電極1'を浸漬し、電極面3cの1cmあたり0.5~1.0mAの一定電流となるよう、電極3a及び3bと对照電極との間に電圧を印加する。電圧を印加する時間は、電極面3cの1cmあたりの電荷が0.5クローンとなるように調整する。このポリアニリン膜8により、溝4の部分が満たされていることを確認した。

さらにポリアニリン膜8上に固定化層9を形成して酵素電極1が完成するわけであるが、その前にポリアニリン膜8を形成した電極がH₂O₂の濃度に対応した電極出力があるか否かを確認しておかなければならない。なぜならば、固定化層9内では、グルコースオキシダーゼ(GOD)による以

下の(1)式の反応が生じ、その生成物であるH₂O₂によりポリアニリン膜8が酸化され、その導電率の変化によりグルコース濃度を知ることができるからである。



そこで、後述の測定系11を用い、電極3a、3b間に0.2Vの電圧を印加して、種々の濃度のH₂O₂を流入させると、第4図に示すような電極出力が得られた。この第4図の結果より、このポリアニリン膜8を形成した電極がグルコース濃度測定に適用できることが明らかとなる。

次に、ポリアニリン膜8上にグルコースオキシダーゼを固定化して、固定化層9を形成する。リン酸緩衝液(又は蒸留水)を溶媒として1%のグルタルアルデヒドの溶液を調製し、このグルタルアルデヒド溶液に、グルコースオキシダーゼを1mgあたり1mg溶解した酵素溶液を用意する。この酵素溶液中に、少なくともポリアニリン膜8の部分を浸漬し、4℃で一昼夜おけば、固定化層9が形成され酵素電極1として完成する。

第3図は、この実施例酵素電極1が適用される測定系11を示す図である。この測定には、0.1モルリン酸緩衝液(pH7.0)12を用いており、13はこのリン酸緩衝液12を貯溜する容器である。14、15は、それぞれ窒素ガスの流入口、流出口である。これは、リン酸緩衝液12中に窒素ガスをバブリングして、リン酸緩衝液12中の酸素を除くためである。

リン酸緩衝液12は、ペリスタリックポンプ16により、フローライン17を循環させることができる。フローライン17上には、リン酸緩衝液12の流れる方向に、試料注入口18、反応槽19、試料排出口20、反応槽21が配設される。反応槽19内には、酵素電極1が、反応槽21内には白金よりなる対極22及び銀/塩化銀より成る参照電極23が入れられている。反応槽19、21は、リン酸緩衝液により電気的に接続(液路)しており、酵素電極1、対極22及び参照電極23の3つの電極を用いる、いわゆる三電極方式により測定が行われる。反応槽を2つにわけたのは、

単に実験上の都合によるものである。

上記酵素電極1、対極22及び参照電極23は、電圧を印加したり電極出力を検出するポテンシオスタット24に接続されており、さらにこのポテンシオスタット24には、電極出力を記録するためのレコーダ25が接続されている。酵素電極1の電極3a、3b間には先と同様、0.2Vの電圧が印加され、これら両電極3a、3b間の電流が電極出力として記録される。

測定を行う際には、先ずリン酸緩衝液12をフローライン17に循環させておき、酵素電極1の出力を安定させておく。次に、試料注入口18より試料をフローライン17に注入する。この試料は、反応槽19内に流入し、酵素電極1の固定化層9内で前記(1)式の反応を生じさせる。この(1)式の反応で生じたH₂O₂により、ポリアニリン膜8が酸化されてその導電率が変化し、それに伴って電極出力も変化する。

電極出力の変化が得られたならば、試料排出口20のコックを操作し、試料を排出させる。試料

が排出されたならば、再び試料排出口20を閉じ、リン酸緩衝液がフローライン17を循環するようにされる。この間、酵素電極1は循環するリン酸緩衝液で洗浄されると共に、電極3a、3b間に印加される電圧(0.2V)によりポリアニリン膜8が還元されていく。電極出力が安定したならば、次の測定を行うことができる。

第5図は、グルコース濃度が既知の試料を用いて得られた電極出力(nA)を白丸(○)でプロットしたものであり、このプロットを結んで得られた曲線を、未知試料のグルコース濃度を測定する際の検量線として使用することができる。

なお、上記実施例では、酵素としてグルコースオキシダーゼを使用しているが、他の酵素を使用して、異なる生化学物質の濃度を測定することも可能である。また、酵素電極の形状も上記実施例のものには限定されない。

(へ) 発明の効果

以上説明したように、この発明の酵素電極は、少なくとも1対の電極と、これら電極間を橋絡す

る導電性有機高分子膜と、この導電性高分子膜上に形成され、検体中の生化学物質と反応する酵素を固定化した固定化酵素膜とを備え、この固定化酵素膜内での酵素反応の生成物により、前記導電性有機高分子膜が酸化又は還元されてその導電率に変化するものであり、以下に列挙する効果を有している。

- ①電極出力は電極間のギャップにより定まり、電極面積に依存しないから、酵素電極を微小化できる。
- ②導電率の測定であるから、測定回路が簡単となり、そのインテリジェント化も容易である。
- ③アンペロメトリーではないので干渉物質の影響を受けることなく、またポテンシオメトリーでもないので、導電性有機高分子膜を酸化あるいは還元する強力な酸化剤又は還元剤を除いて妨害イオンの影響を受けない。
- ④導電率の検出であるため、応答が速くまた測定可能な濃度範囲が広い。
- ⑤電位差検出ではなく導電率の検出であるから、

測定精度が優れており、電極出力が安定して測定可能になるまでの時間がきわめて短い。

⑩イオン選択膜、選択性透過膜が不要であり、電極の構成が簡単で製造が容易で、耐久性に優れている。

⑪導電性有機高分子膜は電解重合法という簡易な方法で、しかも限られた部分(電極面)にのみ形成することができるから、効率よく酵素電極を製作することができる。

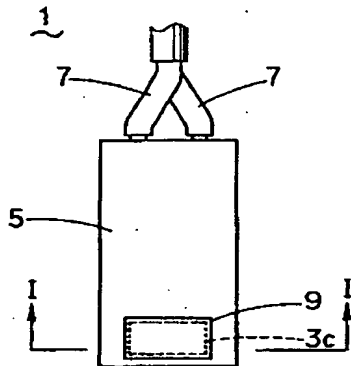
4. 図面の簡単な説明

第1図(a)は、この発明の一実施例に係る酵素電極の平面図、第1図(b)は、同酵素電極の第1図(a)中I-I線における断面図、第2図(a)は、同酵素電極の製作工程の一過程における平面図、第2図(b)は、同酵素電極の第2図(a)中II-II線における断面図、第3図は、同酵素電極に適用される測定系を説明する図、第4図は、同酵素電極の過酸化水素に対する特性を示す図、第5図は、同酵素電極のグルコース濃度に対する電極出力を説明する図である。

3a・3b: 電極、8: ポリアニリン膜、9: 固定化層。

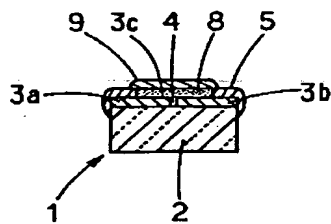
特許出願人 立石電機株式会社
代理人 弁理士 中村茂信

第 1 図 (a)

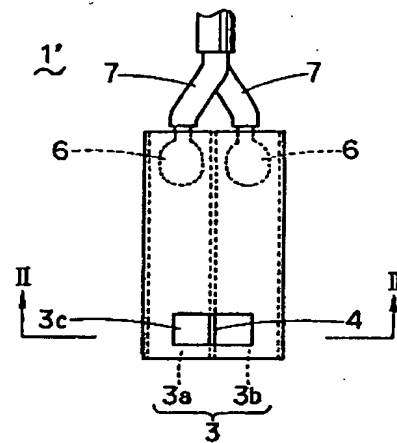


3a・3b: 電極
8: ポリアニリン膜
9: 固定化層

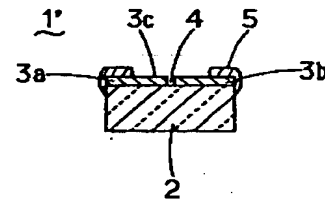
第 1 図 (b)



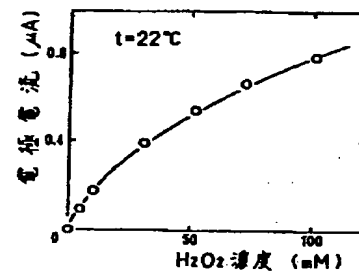
第 2 図 (a)



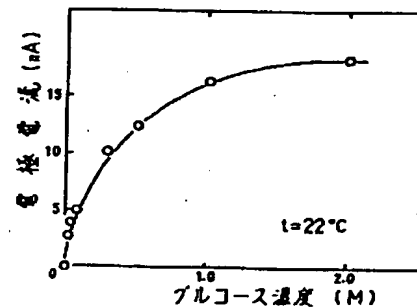
第 2 図 (b)



第 4 図



第 5 図



第 3 図

